



TITLE:

小胞体膜のリン脂質フリップフロ ップ制御機構に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

中尾, 裕之

CITATION:

中尾, 裕之. 小胞体膜のリン脂質フリップフロップ制御機構に関する研究. 京都大学, 2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20300>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-07-11に公開; Chemical physics、Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes : DOI付で出版社版のリンクを表示。Biophysical Journal : 出版社版のリンクを表示、出版社の著作権・出典を明記

京都大学	博 士（ 薬科学 ）	氏 名	中尾裕之
論文題目	小胞体膜のリン脂質フリップフロップ制御機構に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>脂質二重膜を構成するリン脂質の自発的なフリップフロップは、親水性の頭部基が疎水性の炭化水素領域を通過する必要があるため、遅い反応である（$t_{1/2}$ = 数時間～数日）。生体膜では、このフリップフロップ速度が様々に制御されている。小胞体はリン脂質の主な生合成サイトであるが、リン脂質の生合成は細胞質側のみで行われている。二重膜構造を維持するため、新たに合成されたリン脂質は速やかに内腔側へ移行する必要があり、小胞体膜のフリップフロップは非常に速い（$t_{1/2}$ = 数分～十数分）。小胞体膜のフリップフロップについては、複数の膜タンパク質が関与することが示唆されているものの、フリップフロップを促進するタンパク質、“フリッパーゼ”は未だ同定されていない。</p> <p>複数の膜タンパク質が関与するという知見から、著者は、特定のタンパク質が小胞体膜フリッパーゼとして機能しているのではなく、一部の膜タンパク質の膜貫通領域が有する、ある共通の特性がフリッパーゼ機能を生み出すのではないかと考えた。この仮説を検証するため、本研究では、小胞体膜フリッパーゼの同定を目指し、フリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質の解明と、その情報をもとにしたフリッパーゼ候補の探索を行った。</p> <p>第一章 モデル膜貫通ペプチドによるフリップフロップの制御</p> <p>本章では、フリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質の解明を目指した。膜貫通配列の中央に荷電性アミノ酸、もしくは親水性アミノ酸を配置したモデル膜貫通ペプチドと、疎水性部分の長さが異なるモデル膜貫通ペプチドを合成し、リポソームに組み込んで、ペプチドのフリップフロップ促進能を評価した。その結果、配列中央に配置した荷電性アミノ酸（Lys、Glu）、親水性度の高いアミノ酸（Gln、Asn、His）が、フリップフロップを促進するのに重要であることを見出した。さらに、膜貫通領域予測プログラムSOSUIで予測した、ヒト小胞体膜タンパク質の膜貫通領域の中央付近には、フリップフロップ促進能をもつと考えられるアミノ酸が、7%程度存在することが示された。また、ペプチドの疎水性部分の長さが二重膜の疎水性領域の長さより短いペプチドが、フリップフロップ促進能を有することが明らかとなった。</p> <p>第二章 カリウムチャネルKcsAによるpH依存的なフリップフロップの促進</p> <p>本章では、膜タンパク質のコンホメーション変化がフリップフロップに与える影響について評価するため、カリウムチャネルKcsAをリポソームに組み込んで、様々な条件でのフリップフロップ促進能の変化を測定した。その結果、ゲートの開閉が起る酸性条件下で、KcsAのフリップフロップ促進能が増大した。ゲートを</p>			

開構造で静止させた条件で、フリップフロップ促進能が変化しなかったこと、開確率を低下させる変異体では活性が低下したことから、KcsAが開構造をとるとき、フリップフロップ促進能が増大することが示唆された。KcsAは開構造をとるとき、膜貫通領域の長さが短くなることが知られている。そのため、第一章と同様、疎水性部分の長さが膜厚よりも短くなることで、フリップフロップが促進されたと考えられる。

第三章 小胞体膜タンパク質の膜貫通配列によるフリップフロップの促進

本章では、第一章で得られた、膜貫通領域中央の荷電性、親水性アミノ酸がフリップフロップを促進する、という知見をもとに、小胞体膜フリッパーゼ候補の探索を行った。フリップフロップの促進に関与すると考えられるアミノ酸が膜貫通領域の中央付近に存在するヒト小胞体膜タンパク質のうち、一回膜貫通タンパク質の膜貫通配列ペプチドを合成し、そのフリップフロップ促進能を評価した。その結果、多くのペプチドはあまりフリップフロップを促進しなかったが、EDEM1の膜貫通配列ペプチドが顕著なフリップフロップ促進能を示したため、EDEM1が小胞体膜フリッパーゼとして機能している可能性が示された。また、EDEM1ペプチドでは、 α ヘリックス上で、2つの親水性残基がヘリックスの軸に平行に並ぶため、この近傍を脂質頭部が通過することでフリップフロップが促進されたのではないかと推察される。

以上、本研究では、膜貫通領域の中央に親水性アミノ酸を有すること、及び、膜貫通領域の長さが膜厚よりも短いことが、フリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質であることを明らかにし、これらの知見をもとに、EDEM1が小胞体膜のフリップフロップに関与する可能性を示した。本研究結果は、小胞体膜フリップフロップの制御機構解明、及び、膜タンパク質によるフリップフロップ促進の分子機構解明に寄与することが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、小胞体膜のリン脂質フリップフロップ制御機構の解明を目的とし、フリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質を明らかにし、その情報をもとに、小胞体膜スクランブラーゼ候補の探索を行った。第一章では、膜貫通配列中央の親水性度の高いアミノ酸残基が、膜貫通ペプチドのフリップフロップ促進に重要であることを明らかにした。第二章では、カリウムチャネル **KcsA** のフリップフロップ促進能が、酸性 pH で上昇することを明らかにした。酸性 pH で **KcsA** が開構造をとることが、フリップフロップ促進能の上昇に寄与していることが示唆された。第三章では、小胞体膜タンパク質 **EDEM1**、**SPAST** の予測膜貫通配列のペプチドが、フリップフロップを促進することを明らかにした。これらのペプチドの高い活性は、膜貫通配列中央付近に、**Arg**、**His** という 2 つの残基を有するためであることが示唆された。また、**EDEM1** ペプチドのフリップフロップ促進機構としては 2 つの残基がヘリックスの同じ面に位置するため、その近傍を脂質頭部が通過することで、フリップフロップが促進されるというメカニズムが推察される。

以上の結果により、リン脂質のフリップフロップを促進する膜貫通領域の物理化学的性質として、膜貫通配列中央の親水性残基の存在および膜貫通領域と膜の **negative mismatch** という 2 つを明らかにした。さらに、**EDEM1** タンパク質が小胞体膜スクランブラーゼ候補となる可能性が示唆された。本研究は、小胞体膜のフリップフロップ制御機構解明に寄与するだけでなく、膜タンパク質によるフリップフロップ促進の分子メカニズム解明においても、有益な情報となることが期待される。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 2 月 17 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。